

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de Fin de Cycle
En Vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Alimentaire Sanitaire

Thème

**Extraction et essai de purification d'une
substance antifongique produite par
Lactobacillus paracasei subsp *paracasei***

Présenté par

M^{elle} BOUTAGHANE Soraya

M^{elle} CHOUCHA Amina

Membres de jury :

Présidente : Mme IDRES

Examinatrice : Mme BENACHOUR

Promoteur : Mr BENDJEDDOU

2013 / 2014

Remerciement

Nous tenons à exprimer nos remerciement à Allah de nous avoir donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à notre encadreur Dr. BENDJEDDOU Kamel, pour ses conseils judicieux, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner nos profondes gratitude.

Nos remerciements s'adressent également à Madame IDRES pour le grand honneur de présider le jury.

A Madame BENACHOUR, on vous remercie d'avoir voulu examiner notre travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*Mes chers parents que j'aime beaucoup et à qui je dois le mérite
d'en arriver là, que Dieu tout puissant vous protège.*

Mes frères Arab et Lyes.

Ma sœur Samira et son mari, ma sœur Wahiba.

Ma grand-mère.

Mes tantes et mes oncles et à toute ma famille.

Ma nièce Imane.

Ma chère Amina et tous mes amis.

La promotion de Microbiologie Alimentaire Sanitaire 2013-2014.

Soraya

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers parents pour leur soutien et leur amour, que
dieu vous protège.*

Mes sœurs : Naima, Katia, Nassima.

Mes frères : Kiki et Moumouh.

Mes grands-parents et toute ma famille.

Chère amie et binôme Soraya.

Tous les étudiants de la promotion M.A.S 2013-2014.

Amina

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

B : Bifidobactérie

B. cereus : *Bacillus cereus*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

E. coli : *Escherichia coli*

E : *Enterococcus*

EPEC : Entéropathogène *Escherichia coli*

Lb : *Lactobacillus*

LCD : Liquide de contre dialyse

MRS : Man Rogosa Charp

pH : potentiel d'hydrogène

P : *Pediococcus*

S : *Saccharomyces*

SC : Surnagent concentré

SNC : Surnagent non concentré

St : *Streptococcus*

TFA : Trifluoroacétique

UA : Unité Arbitraire

Liste des figures

figure	titre	page
Figure1	Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques del'ordre «Lactobacillales » dans la classe des « bacilli »	03
Figure 2	protocole de concentration de la substance antimicrobienne.	13
Figure 3	montage de la chromatographie	15
Figure 4	Protocole de purification partielle de la substance antimicrobienne	16
Figure 5	Courbe d'étalonnage de la protéine BSA	18
Figure 6	L'activité antibactérienne de surnageant concentré et non concentré à l'égard d' <i>E. coli</i>	19
Figure 7	L'activité antifongique de surnageant concentré et non concentré à l'égard de <i>Candida albicans</i>	20
Figure 8	L'activité de surnageant concentré, liquide contre dialyse et le dialysat à l'égard d' <i>E.coli</i> : (a) surnageant concentré, (b) liquide contre dialyse, (c) dialysat	22
Figure 9	L'activité de surnageant concentré, liquide contre dialyse et le dialysat à l'égard de <i>Candida albicans</i> : (a) surnageant concentré, (b) liquide contre dialyse, (c) dialysat	22
Figure 10	L'activité des fractions actives correspondantes à 0%, 10%, 20% et 30% d'acétonitrile : (a) 0%, (b) 10%, (c) 20%, (d) 30% à l'égard d' <i>E. coli</i> .	25
Figure11	L'activité des fractions actives correspondantes à 0%, 10%, 20% et 30% d'acétonitrile : (a) 0%, (b) 10%, (c) 20%, (d) 30% à l'égard de <i>Candida albicans</i>	26

Figure 12	Effet de traitement thermique sur l'activité antifongique à l'égard de <i>Candida albicans</i> .	29
Figure 13	Effet de pH sur l'activité antifongiques des différentes fractions à l'égard de <i>Candida albicans</i>	30
Figure 14	Effet des enzymes sur l'activité antifongique à l'égard de <i>Candida albicans</i>	31

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Exemple de quelque espèce de <i>lactobacillus</i> utilisé en industrie	04
Tableau II	Effet bénéfique de quelque souche de <i>lactobacillus</i> sur la santé humaine	05
Tableau III	Exemple de produits probiotique commerciaux du genre <i>lactobacillus</i> et ces applications	06
Tableau IV	Activité antifongique de certaines espèces de genre <i>Lactobacillus</i>	11
Tableau V	Préparation des différentes solutions de la phase mobile	15
Tableau VI	Diamètre des zones d'inhibition et nombre d'unités arbitraire du surnageant concentré, du liquide contre dialyse et du dialysat.	23
Tableau VII	Diamètre de zone d'inhibition et nombre d'unités arbitraires des fractions actives.	27

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Recherche bibliographique

I.	Bactéries lactiques.....	2
	I.1 Définition et caractéristiques.....	2
	I. 2 Classification des bactéries lactiques.....	2
	I. 3 Intérêt des bactéries lactiques.....	3
	I.3.1. Dans l'industrie alimentaire.....	3
	I.3.2. Dans le domaine thérapeutique.....	5
II.	Effet antimicrobiennes de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> ...	6
	II.1. Effet antibactériennes.....	6
	II.2. Effet antifongiques.....	9
	II.2.1. Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action.....	9
	II.2.2. Les composés antifongiques.....	10

Matériels et méthodes

I.	Les souches utilisées.....	12
II.	Réification des souches.....	12
III.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	12
IV.	Mise en évidence de l'activité antifongique.....	13

V.	Extraction des substances antimicrobiennes.....	13
V.1	Dialyse.....	14
V.2	Chromatographie en phase inverse.....	14
VI.	Dosage des protéines.....	17
VII.	Caractérisation des substances antimicrobiennes.....	17
VII.1	Effet de température sur l'activité antifongique.....	17
VII.2	effet de pH sur l'activité antifongique.....	18
VII.3	Effet des enzymes sur l'activité antifongique.....	18

Résultats et discussions

I.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de surnageant concentré et non concentré à l'égard d' <i>E. coli</i>	19
II.	Mise en évidence de l'activité antifongique de surnageant concentré et non concentré à l'égard de <i>Candida albicans</i>	20
III.	Extraction des substances antimicrobiennes.....	21
III.1.	La dialyse.....	21
III.2	Chromatographie en phase inverse.....	24
IV.	Caractérisation des substances antimicrobiennes.....	28
IV.1	Effet de température.....	28
IV.2	Effet de PH.....	29
IV.3	Effet des enzymes.....	30
	Conclusion	32

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Introduction

Les champignons, les levures et les bactéries sont les premiers responsables de l'altération des produits alimentaires. Les pertes dues à la contamination fongique sont évaluées de 5-10% de la production alimentaire mondiale. Les espèces appartenant au genre *Penicillium* et *Aspergillus*, ainsi que les levures du genre *Candida* et *Rhodotorila* sont considérés comme les plus grands ravageurs. Différents moyens ont été déployés afin de lutter la contamination fongique des aliments. Parmi ces moyens on cite l'utilisation des cultures bioprotectrices actives contre les champignons comme la lactiques (**Chobert et Choiset ; 2011**).

Certaines bactéries lactiques produisent des substances antifongiques et/ou antibactériennes (**Louis et al 2008**). Elles sont largement utilisées dans l'industrie culture de bactéries alimentaire en tant que starters dans les procédés de fermentation, afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques. Leur apport bénéfique consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne (**Dortu et Thonart, 2009; Moraes et al., 2010**).

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un nombre de fermentation spontanée de produit alimentaire (**stiles et al ; 1997**), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (**klaenhammer et al., 2005**), en particulier les lactobacilles et les bifidobactéries. Par ailleurs, plusieurs études réalisées sur des souches de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ont montré qu'elles possèdent des propriétés probiotiques avec production de bactériocines actives contre de nombreuses espèces bactériennes Gram positif, Gram négatif et des levures (**Atanassova et al., 2003, Verdenelli et al., 2009**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'utilisation d'une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, afin de lutter contre les contaminations fongiques causé par *Candida albicans*.

Recherche bibliographique

I. Les bactéries lactiques

I.1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques est un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilles (**Badis *et al.*, 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulées, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C, alors que la majorité des souches se développent à des pH allant de 4,0 à 4,5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme des glucides (**Salminen *et al.*, 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka *et al.*, 2011**).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase, elles sont peu protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux. (**Dellaglio *et al.*, 1994; Salminen *et al.*, 2004**).

Les bactéries lactiques colonisent les habitats riches en nutriments tels que les plantes, les fruits, les produits laitiers, les eaux usées, les jus, ainsi que les cavités buccales, vaginales et intestinales de l'homme, sans pour autant lui provoquer des maladies, à l'exception de quelques cas causés par les streptococci et certains lactobacilli (**König et Fröhlich, 2009 Wilson *et al.*, 2008**).

I.2. Classification des bactéries lactiques

Selon la dernière édition de Bergey's manuel of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis dans six familles (**Fig.1**). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Pediococcus*.

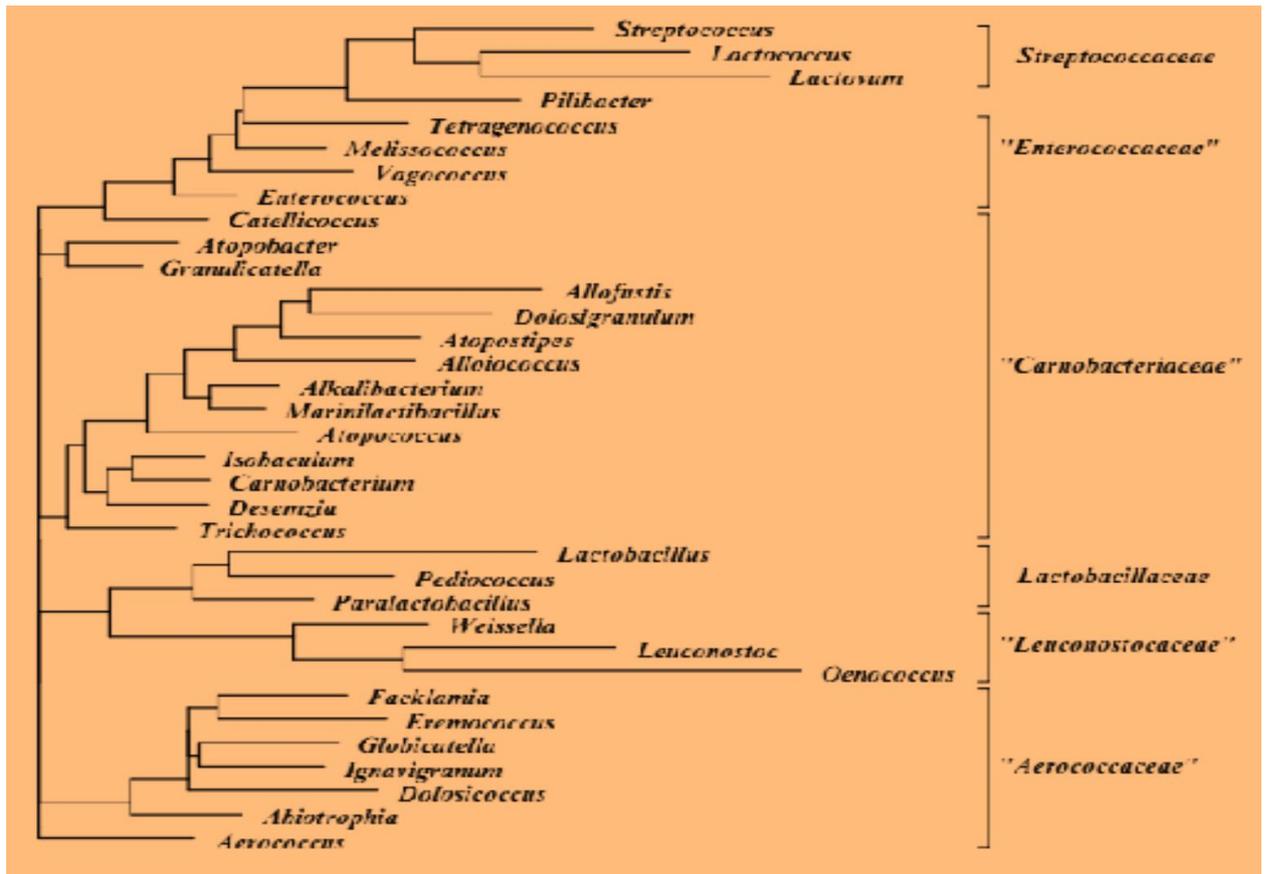


Fig.1 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre «Lactobacillales » dans la classe des « bacilli » (De Vos *et al.*, 2009).

I.3. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique, parmi ces bactéries on cite le genre *Lactobacillus* qui a un rôle important dans ces domaines.

➤ Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem *et al.*, 2008). Les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu

et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères comme absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (**Marth et Steele., 2001**). Les lactobacilles sont les plus utilisés dans le domaine alimentaire, comme il est présenté dans le tableau suivant :

Tableau I : Exemple de quelques espèces de *Lactobacillus* utilisées en industrie alimentaire (**Lamontagne et al., 2002**)

Espèces	Emploi en industrie	Rôle
<i>Lb. bulgaricus</i>	Yogourt- fromage (mozzarella)	Acidification en cours de production protéolyse, en cours de maturation, libération du galactose pour le brunissement, production d'arôme et de polysaccharides (yogourt).
<i>Lb. helveticus</i>	Fromage (suisse, mozzarella)	Acidification en cours de production, prévention de l'amertume (peptidase)
<i>Lb. casei</i>	Yogourt- fromage (cheddar)	Un peu d'acidification en cours de production contribution au caractère probiotique
<i>Lb. acidophilus</i>	Yogourt- lait acidophile	Acidification en cours de production contribution au caractère probiotique
<i>Lb. kefir</i>	Kéfir	Acidification en cours de production

➤ **Domaine thérapeutique**

Les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant un équilibre de la microflore intestinale et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al., 2008**). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (**Mkrтчyаn et al., 2010**). D'autres auteurs ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**). Le tableau suivant présente quelques souches de lactobacilles à intérêt thérapeutique.

Tableau II : Effet bénéfique de quelques souches de *Lactobacillus* sur la santé humaine (Pirioult., 2003).

Souche	Effet observés chez l'humaine
<i>Lb. rhamnosus</i> (GG)	Prévention des allergies Traitement des allergies Diminution de l'incidence des diarrhées Diminution des diarrhées à rotavirus
<i>Lb. johnsonii</i> (La1) (Lj1)	Inhibition du développement d' <i>helicobacter pylori</i> Stimulation de l'activité phagocytaire
<i>Lb. casei</i> (Shirota)	Augmentation de l'activité des cellules NK Diminution des diarrhées à rotavirus
<i>Lb. acidophilus</i> (NCFM)	Diminution des diarrhées infantiles Facilite la digestion de lactose
<i>Lb. plantarum</i> (229V)	Prévention des maladies cardiovasculaires
<i>Lb. casei</i> (DN-114001)	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'incidence des diarrhées

Les Lactobacilles sont considérées comme des probiotiques, le tableau suivant présente quelques produits probiotiques à base de souches de *Lactobacillus*.

Tableau III : Exemple de produits probiotique commerciaux du genre lactobacillus et ces applications (Alegre., 2009).

Produits	Souches	Effet revendiqué
Actimel	<i>Lb. casei</i> DN- 114001	Renforce les défenses naturelles de l'organisme
Yakult	<i>Lb. casei shirota</i>	Régule le transit et renforce les défenses naturelles
BION- transit	<i>Lb. plantarum</i> 299V	Evite l'inconfort intestinal et les ballonnements
BION- flore intime	<i>Lb. rhamnosus</i> GR-1 <i>Lb. reuteri</i> RC-14	Restaure et protège l'équilibre de la flore vaginale
Lactéal	<i>Lb. acidophilus</i>	Evite la diarrhée
Gefilus	<i>Lb. Rhamnosus</i> GG	Renforce les défenses naturelles de l'organisme multiples effets sur la sante

II. Effet antimicrobien de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*

II. 1. Effet antibactérien

Plusieurs travaux ont rapporté l'efficacité de *Lactobacillus paracasei* dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable et les diarrhées associées à l'antibiothérapie chez les enfants (Gawronska *et al.*, 2007). Caridi, (2002) a montré l'effet antibactérien de *Lb paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard d'*E. coli*. Une autre étude menée par Tsia *et al.*, (2010) a montré la possibilité d'utiliser *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* pour la prévention des infections entériques causées par *E. coli* O157 : H7. Selon Aronsson *et al.*, (2010),une souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* F19 est capable de prévenir le développement de l'obésité chez les souris. D'après Bendjeddou, (2013) une souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005 est responsable de l'effet antagoniste à l'égard d'EPEC. Les travaux de Wang *et al.*, (2004), montrent que l'ingestion de lait fermenté contenant *Lb.*

paracasei 33 pendant 30 jours permet d'améliorer la santé des patients souffrant d'une rhinite allergique.

L'étude menée par **Bendali et al., (2011)**, a montré un effet anti *Staphylococcus aureus* d'une souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

L'activité antibactériennes des Lactobacilles a été prouvé *in vitro* contre plusieurs pathogènes, cette activité est due à la production de plusieurs substances antimicrobiennes

➤ **Acides organiques :**

Grâce à la production d'acides organiques, en particulière l'acide lactique et l'acide acétique, les lactobacilles diminuent le pH du milieu dans lequel ils se multiplient, ce qui provoque l'inhibition d'une partie de la flore qui s'y développe. (**Zalan et al., 2010**). L'acide lactique est le métabolisme principal des bactéries lactiques, il provoque la réduction du pH qui inhibe beaucoup de microorganisme (**Schnurer et Magnusson., 2005**). En plus de l'acide lactique, les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent aussi de l'acide acétique. (**Eklund 1989**).

➤ **Acides gras :**

Dans certains cas, quelques lactobacilles possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait (**Rao et al., 1984**) et des saucisses sèches (**Sanz et al., 1988**). L'activité antimicrobienne des acides gras a été mise en évidence depuis plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram⁺. L'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration et du pH du milieu (**Gould, 1991**).

➤ **Peroxyde d'hydrogène :**

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O₂) en super oxyde excité (O₂^{*}), en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou en eau (H₂O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (**Condon, 1987**).

L' H_2O_2 peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O_2^-) et radicaux d'hydroxyle (OH^\cdot) qui peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner, 1988**).

La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques dépend en grande partie de la souche et la disponibilité de l'oxygène (**Helander et al., 1997**)

➤ **Dioxyde de carbone (CO_2) :**

Il est principalement produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobien est toujours mal compris. Cependant, le CO_2 peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobie, qui empêche la décarboxylation enzymatique. L'accumulation de CO_2 dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (**Eklund et al., 1984**).

Le degré d'inhibition par le CO_2 varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO_2 de 10% pourrait diminuer la population bactérienne aérobie de 50% (**Wagner et Moberg, 1989**), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (**Lindgren et Dobrogosz, 1990**).

➤ **Diacétyl :**

Le diacétyl est produit suite à la dégradation du citrate, il agit sur l'utilisation de l'arginine. Il est synthétisé par différentes espèces de bactéries lactiques appartenant à plusieurs genres comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Ses propriétés antimicrobiennes sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques. La concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition dépend essentiellement du microorganisme cible (**Ammor, 2004 ; Dortu, 2008**).

➤ **Les bactériocines :**

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiées post-traditionnellement ou non (**Heng et al., 2007**). L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort du germe cible, soit bactériostatique inhibant la croissance microbienne. Les bactériocines les plus étudiées

sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (Cotter *et al.*, 2005b).

Les lactobacilles sont capables de produire des bactériocines de toute les classes connues (Klaenhammer, 1993), certain de ces bactériocines sont douées à la fois d'activités antibactérienne et antifongique comme la Pentocine TV35b produite par *Lb. pentosus* (Okkers *et al.*, 1999 ; Atanassova *et al.*, 2003).

Plusieurs travaux ont montré que les souches *Lb. paracasei* isolées de différentes niches écologiques sont capables de produire des bactériocines différentes ayant un large spectre d'activité qui touche des bactéries Gram positif et Gram négatif, des levures et des moisissures (Atanassova *et al.*, 2003 ; Hassan et Bullerman, 2008, Verdenelli *et al.*, 2009).

Toutes les bactériocines des bactéries lactiques dont le mode d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles (Hasting *et al.*, 1991 ; Héchard *et al.*, 1992).

II.2. Les bactéries lactiques et leur effet antifongique

Les bactéries lactiques connues dans la littérature comme présentant des propriétés antifongiques, appartiennent fréquemment au genre *Lactobacillus* et quelque rares fois aux genres *Lactococcus* et *Pediococcus*. Parmi les *Lactobacillus*, l'espèce *Lactobacillus plantarum* revient souvent, suivie de *Lactobacillus casei*.

Le spectre d'activité de ces bactéries est très variés, regroupant des moisissures des genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* et des espèces de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* (Djossou 2011).

II.2.2 Les composés antifongiques

Les tout premiers composés antifongiques identifiés chez les bactéries lactiques sont des métabolites primaires, souvent des acides organiques, produits au cours de la croissance du microorganisme. Il s'agit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acide formique et du peroxyde d'hydrogène (Lindgren & Dobrogosz, 1990). D'autres acides ont été mis en évidence chez *Lactobacillus plantrum*, ce sont l'acide benzoïque, l'acide 3-phenyllactique et l'acide 4-hydroxy-phenyllactic acid (Ström

et al., 2002; Lavermicocca *et al.*, 2000; Niku-Paavola *et al.*, 1999). Certains auteurs ont mis en évidence des protéines antifongiques chez les bactéries lactiques suivantes : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoparaplantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici* (Djossou 2011).

Beaucoup de travaux ont eu pour objectif de trouver des souches de lactobacilles douées d'activité antifongique, ainsi *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, SM63 associée à *Propionibacterium jensenii* SM11 inhibent la croissance de *Candida pulcherrima*, *Candida magnoliae*, *Candida parapsilosis*, *Zygosaccharomyces bailii* dans le yaourt et le fromage stockés à 6°C pendant 3 semaines (Schwenninger et Meile., 2004). Les cultures mixtes des souches SM20/SM11, SM29/SM11 et SM63/SM11 à prouver aussi leurs efficacités dans la protection de la mozzarella et des salades préemballées contre les champignons (Bogovic *et al.*, 2007). D'après Dalié *et al.*, (2007), *Lb. plantarum* FST1.9 et FST1.7 ajouté à *Saccharomyces cerevisiae* dans le levain de panification inhibe la prolifération de *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* et *penicillium roqueforti* sur le pain.

Des substances comme l'acide phényllactique et l'acide 4-hydroxy-phényllactique isolées des souches de *Lb. plantarum* 21B et 20B ont montré une activité inhibitrice contre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Monilia*. Par ailleurs, une gamme d'acides organiques tels que les acides: acétique, formique, caproïque, propionique, butyrique et valérique libérées par *Lb. sanfranciscensis* CB1, possèdent le même effet contre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Monilia*. Ces acides agissent d'une manière synergique (Gobbetti *et al.*, 2005 ; Lavermicocca *et al.*, 2003).

L'acide lactique produit pendant la croissance des bactéries lactiques et l'acétate de sodium contenant dans le MRS peuvent avoir des effets antifongiques synergiques (Cabo *et al.*, 2002).

Tableau IV : Activité antifongique de certaines espèces de genre *Lactobacillus* (synthèse) (Lavermicocca *et al.*, 2003).

Bactéries lactiques	Organismes Sensibles	Métabolites Antifongiques
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> VT1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Fusarium</i> et autres	Acétate de sodium Peptide cyclique
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	<i>Fusarium</i> et <i>Aspergillus</i>	Peptide
<i>Lactobacillus plantarum</i> 21B	<i>Fusarium</i> et <i>Aspergillus</i>	Acide phényllactique
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> CB1	<i>Fusarium</i> et autres	Acides organiques

Matériels et méthodes

- **Matériel utilisé**

Tubes à essai

Boîtes Pétri

Les écouvillons

Autoclave

Centrifugeuse

Rotavapor

pH mètre

Bain marie

Micropipettes

Bec benzun

Boudin de dialyse

Colonne C₁₈

Spectrophotomètre

- **Milieux de culture**

Bouillon MRS

Bouillon nutritif

Gélose Muller Hinton

- **Matériel biologique**

Une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* qui fait partie de la collection du laboratoire LMA. Elle est conservée à -18° C dans du bouillon MRS additionné de 20% de glycérol.

Les autres souches utilisées sont : *Escherichia coli* et *Candida albicans*, elles sont fournies par le laboratoire Dr. LALAOUI.

I. Culture des souches sur milieu liquide

La revivification des souches est réalisée par trois repiquages successifs sur un milieu de culture approprié pour chaque souche : milieu MRS pour *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* et le bouillon nutritif pour *E.coli* et *Candida albicans*. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h.

II. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* envers *E. coli*

Pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, la méthode des de diffusion sur gélose a été utilisée.

Un tube de 9ml de bouillon MRS estensemencé avec 1ml d'une culture fraîche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* puis incubé à 37°C /24h. À partir de ce tube un flacon de 100ml de bouillon MRS a étéensemencé avec la culture à 1%. Après incubation à 37°C/24h, cette culture est centrifugée à 12000g /20min à 4°C, le surnageant obtenu est concentré 10 fois sous vide à l'aide d'un rotavapor.

La souche cible estensemencée en surface par écouvillonnage à partir d'une culture d'*E. coli* de 10⁷ UFC/ml sur la gélose Muller Hinton. Deux puits de 9mm de diamètre et de 4mm de profondeur sont creusés dans la gélose à l'aide d'un embout stérile, 100 µl de surnageant concentré et non concentré sont déposés dans chacun des puits. La boîte est pré-incubée à 4°C /2h, puis incubée à 37°C/24h. L'activité antibactérienne est détectée par la présence de zone d'inhibition autour des puits.

III. Mise en évidence de l'activité antifongique de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard de *Candida albicans*

L'activité antifongique est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose dans les mêmes conditions précédentes.

V. Extraction des substances antimicrobiennes

L'extraction des substances antimicrobiennes est réalisée en deux étapes : Une dialyse et une chromatographie en phase inverse.

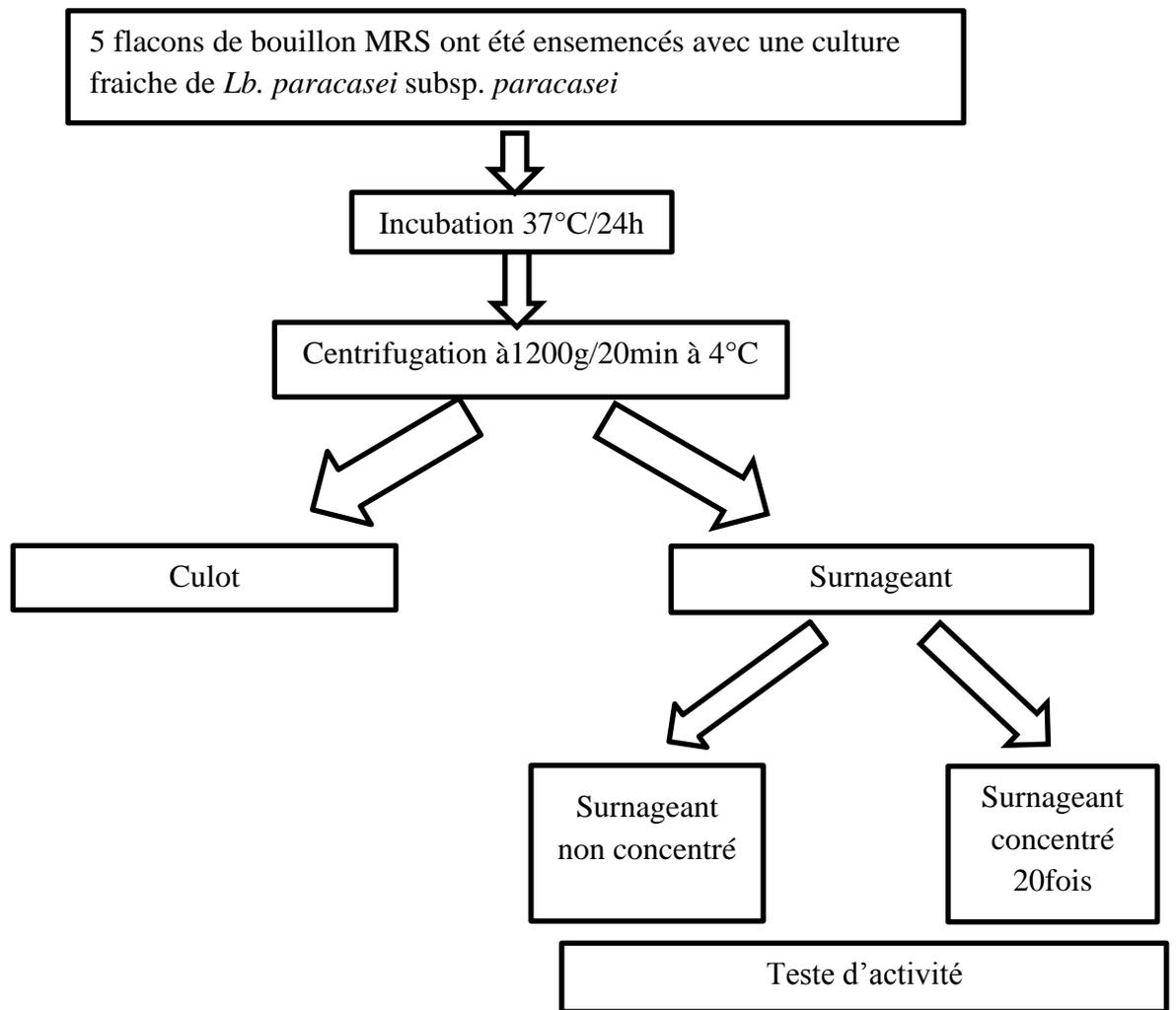


Fig. 2: Protocole de concentration de la substance antimicrobienne (Bendjeddou 2013)

V.1. Dialyse.

La dialyse est une technique permettant l'élimination des composés de taille inférieure au seuil de séparation de la membrane de dialyse.

25ml de surnageant concentré est placé dans un boudin de dialyse d'un seuil de séparation de 5KD. Ce dernier est fermé des deux extrémités et trempé dans 1,5 l d'une solution de contre dialyse (tampon phosphate – citrate à 0,05 M pH 4,5) puis laissé à 4°C pendant 24h. Ensuite, le dialysat est récupéré et le liquide contre dialyse est concentré 60 fois sous vide à l'aide d'un rotavapor, afin d'avoir un volume finale de 25ml (même volume que le dialysat).

➤ **Calcul du nombre d'unités arbitraires**

Pour quantifier les substances antimicrobiennes dans les différentes fractions actives, le nombre d'unités arbitraires par ml est défini par la méthode des dilutions en cascade. Une série de dilutions en cascade à 1/2 du surnageant concentré, du liquide contre dialyse et du dialysat est effectué dans l'eau physiologique suivi d'un test d'activité à l'égard d'*E. coli* et de *Candida albicans* par la méthode des puits.

Le nombre d'unité arbitraire est égal à l'inverse de la dilution maximale donnant une zone d'inhibition, elle est exprimée en unité arbitraire par ml (UA/ml) (**Joerger et Klaenhammer 1986**).

V.2. Chromatographie en phase inverse

C'est une chromatographie d'interaction hydrophobe basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire hydrophobe et une phase mobile hydrophile constituée d'un mélange d'eau et de solvant organiques miscibles dont le pH est fixé de telle sorte que les protéines à séparer soient ionisées. On utilise des silices greffées de chaînes aliphatiques carbonées plus ou moins longues (**Ababsa, 2012**). Dans notre étude les solvants organiques utilisés sont l'acétonitrile et le TFA à 0,05%. Des mélanges d'acétonitriles et de TFA à 0,05% sont préparés selon le tableau suivant :

Tableau V : Préparation des différentes solutions de la phase mobile.

TFA (ml)	Acétonitrile (ml)	Pourcentage d'acétonitrile
120	0	0%
108	12	10%
96	24	20%
84	36	30%
72	48	40%
60	60	50%

La colonne a été équilibrée avec 120ml de TFA à 0,05%, puis avec 120ml d'acétonitrile et en fin avec 120ml de TFA à 0,05%.

Matériels et méthodes

Après avoir passé l'échantillon (LCD) à travers la colonne, elle a été lavée avec 240ml de la solution de TFA 0,05%. L'élution des substances antimicrobiennes est assurée par des solutions de volume de 120ml des mélanges cités dans le tableau V.

Après évaporation des solvants organiques un volume de 5ml de chaque fraction a été obtenu. Un test d'activité à l'égard de *E. coli* et *Candida albicans* des différentes fractions obtenues est réalisé.



Fig. 3 : montage de la chromatographie effectué sur gel C₁₈ de type Discovry DSC-18 (supelco10g, 60ml, USA)

Matériels et méthodes

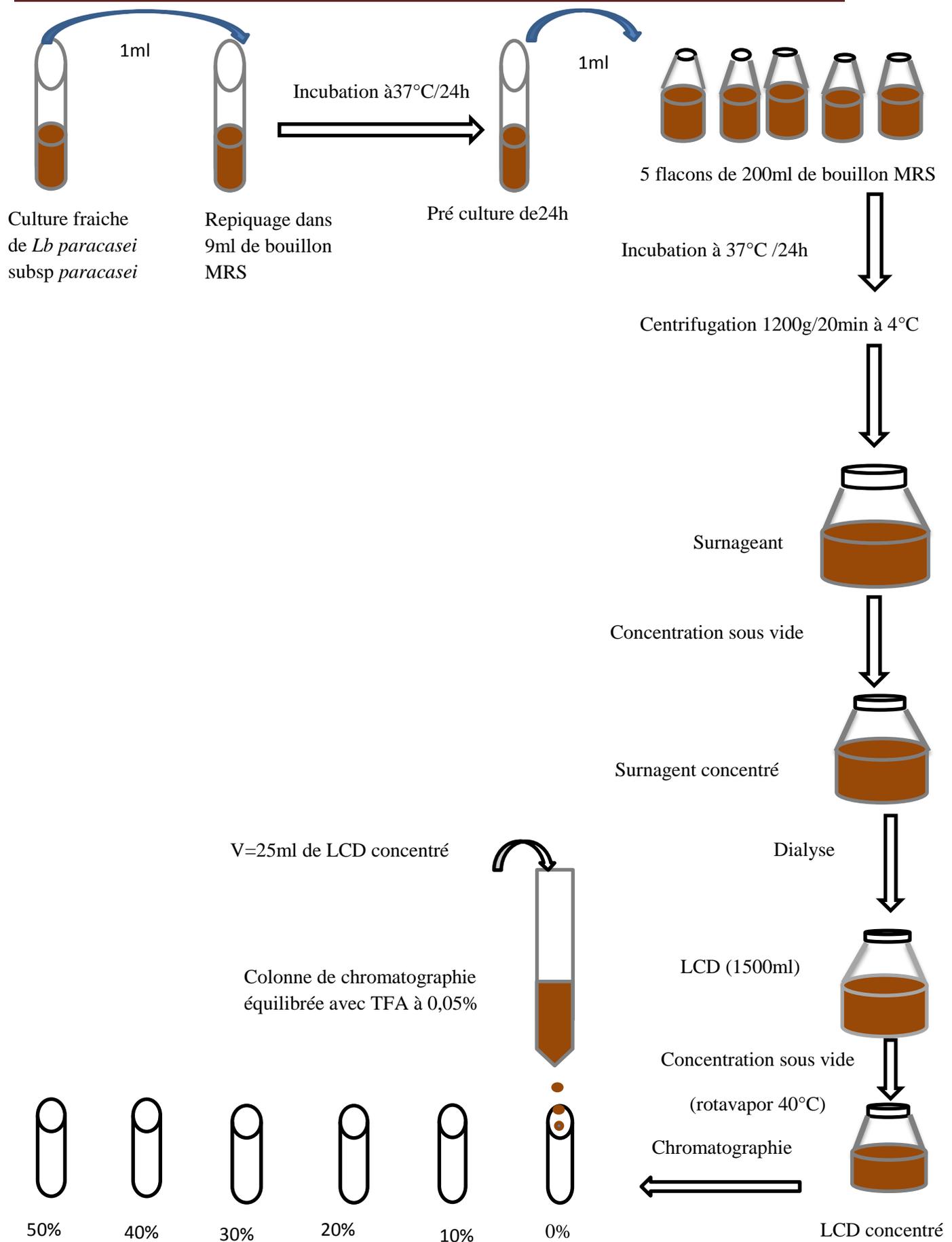


Fig 4: Protocole de purification partielle de la substance antimicrobienne de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei paracasei*

VI. Dosage des protéines

Parmi les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques, on trouve les substances de nature protéique (Dortu et Thonart, 2009 ; Xie *et al.*, 2011).

Afin d'obtenir la concentration en protéines des fractions actives obtenues, la méthode colorimétrique de Bradford est utilisée. Cette méthode est basée sur l'utilisation du bleu de Coomassie G250 en solution acide qui possède la particularité de se lier aux protéines avec un effet immédiat sur son spectre d'absorption. Il se complexe, par des interactions non-covalentes avec les chaînes latérales des acides aminés basiques (lysines, arginine, histidine), aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine) et sur les fonctions amines libres de la chaîne polypeptidique en formant un complexe chromogène de couleur bleue et présentant un maximum d'absorption à 595 nm. (Bradford, 1976).

La concentration en protéines de chaque fraction obtenue (surnageant concentré, liquide contre dialyse, dialysat et les six fractions obtenue avec l'acétonitrile) est estimée par la méthode de Bradford. Des mélanges de 200µl de chaque fraction avec 800µl de réactif de Bradford (bleu de Coomassie G250 à 0,1 mg/ml, 8,5% d'acide orthophosphorique et 4,75% d'éthanol) sont réalisés. Après 20 min de réaction à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm en comparaison avec une gamme étalon de la protéine BSA.

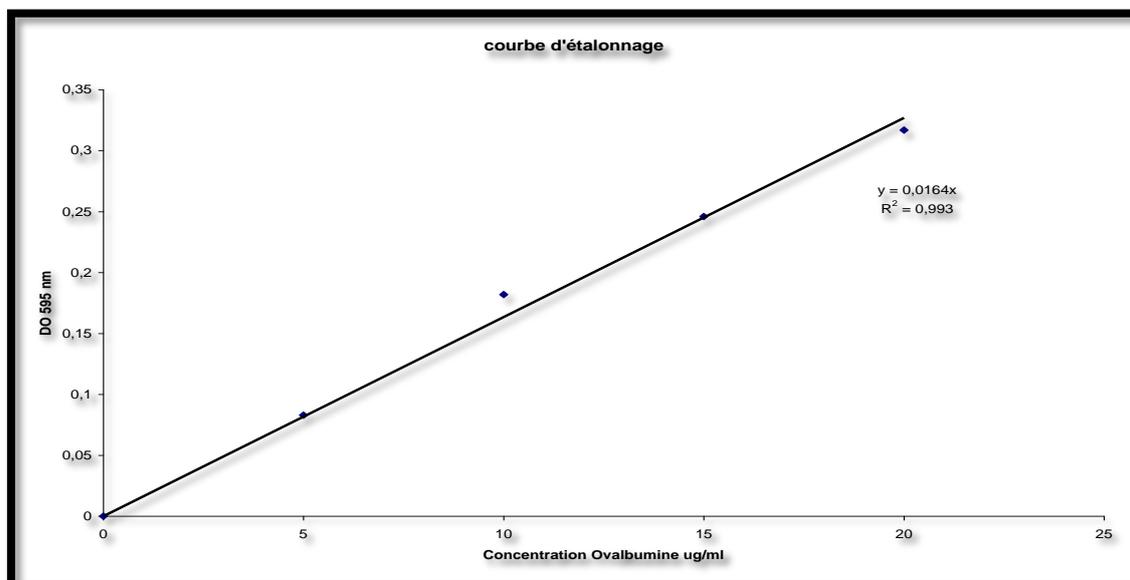


Fig 5: Courbe d'étalonnage de la protéine BSA.

VII. Caractérisation physicochimique des substances antifongiques

La caractérisation physicochimique des substances antimicrobiennes n'a été effectuée que dans la fraction présentant le maximum d'activité (fraction correspond à 0% d'acétonitrile)

VII.1. Effet de la température sur l'activité antifongique

Un volume de 50µl de la fraction correspond à 0% d'acétonitrile est mélangé avec 50µl de tampon phosphate citrate 0,05M à pH 4,5. L'échantillon a été traité à différentes températures 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C pendant 5, 10 et 20 min pour chaque température. Après refroidissement le test d'activité de la fraction est effectué à l'égard de *Candida albicans*. 50µl de chaque échantillon non traité est utilisé comme témoin positif.

VII.2. Effet du pH sur l'activité antifongique

L'activité antifongique de la fraction correspond à 0% d'acétonitrile a été testée sur une gamme de pH en utilisant des différentes solutions tampon à 0,05M à différents pH: glycine – Hcl à pH 2, citrate phosphate à pH 3 ; 4; 5 ; 6, phosphate de sodium à pH 7, tris – Hcl à pH 8, glycine – NaOH pH 9.

50µl d'échantillon est mélangé séparément avec 50µl de chaque tampon. Après agitation, l'activité de la fraction est testée à l'égard de *Condida albicans*.

Un échantillon de chaque solution tampon est utilisé comme témoin négatif, et 50 µl de la fraction sont utilisés comme témoin positif.

VII.3. Effet des enzymes protéolytiques sur l'activité antifongique

Les enzymes utilisées dans ce test sont la papaïne et la trypsine. 1mg de chaque enzyme est mis dans 1ml de solution tampon phosphate de sodium à pH 7. Un mélange de 50µl de la fraction correspond à 0% d'acétonitrile avec 50µl de chaque enzyme ont été

Matériels et méthodes

préparés puis incubés à 37°C /4h. Le test d'activité de la fraction traité par les enzymes est réalisé à l'égard de *Candida albicans*.

Un échantillon de chaque enzyme est utilisé comme témoin négatif, et 50 µl de la fraction sont utilisés comme témoin positif.

Résultats et discussion

I. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* envers *E. coli*

Après 24h d'incubation à 37°C, Les résultats obtenus montrent une bonne activité antibactérienne de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard d'*E. coli*. Cette activité est révélée par l'apparition d'une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre pour le surnageant concentré et de 9 mm de diamètre pour le surnageant non concentré (**Fig. 6**). Ces résultats montrent que *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est capable de produire des substances antibactériennes à l'égard d'*E. coli*.

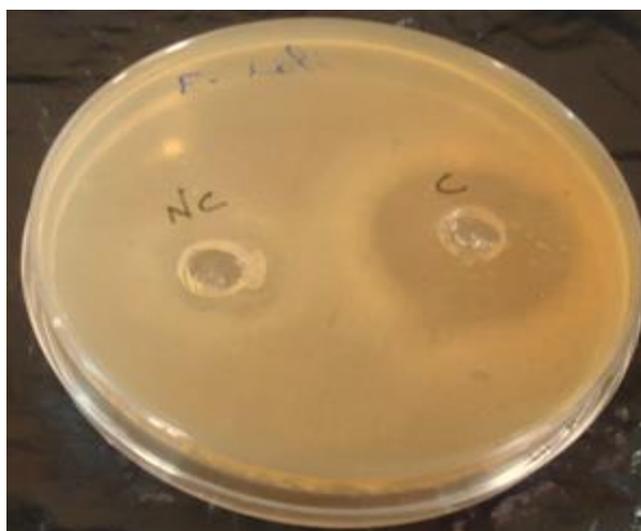


Fig. 6 : L'activité antibactérienne de surnageant concentré et non concentré à l'égard d'*E. coli*

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par (Caridi, 2002) qui a montré qu'une souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* avait une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli*. Cette inhibition est attribuée à la production de substance assimilée à une bactériocine. Une étude publiée par Technical memorandum (2012), a rapporté qu'une souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* Lpc-37 est douée d'un effet antibactérien à l'égard de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Listeria monocytogenes*, cet effet est attribué à la production d'acides organiques, peroxyde d'hydrogène et des bactériocines.

II. Mise en évidence de l'activité antifongique de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* envers *Candida albicans*.

Les résultats montrent une bonne activité antifongique de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard de *Candida albicans*. Cette activité est révélée par l'apparition d'une zone d'inhibition de 19 mm de diamètre pour le surnageant concentré et de 7 mm de diamètre pour le surnageant non concentré (**Fig. 7**). Cette activité est due à la production de substances antifongiques à l'égard de *Candida albicans*.

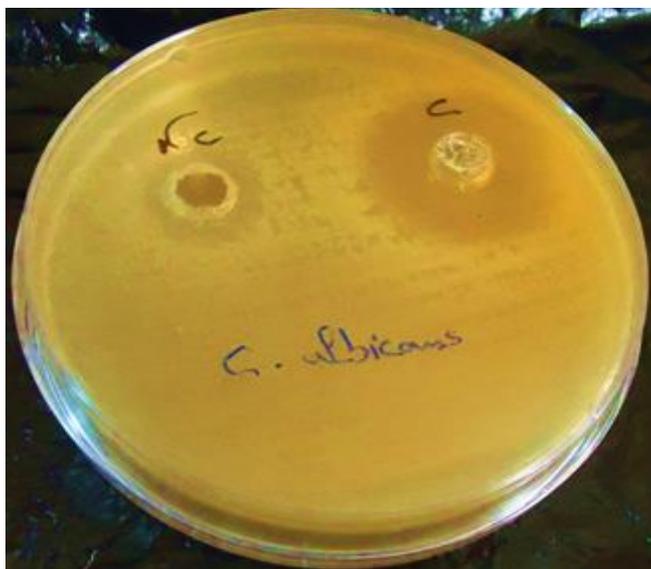


Fig. 7 : L'activité antifongique de surnageant concentré et non concentré à l'égard de *Candida albicans*

La souche *Lb. pentosus* TV35b produit un peptide « bacteriocin-like », la pentocin TV35b, ce peptide est douée d'activité inhibitrice contre des souches de *Candida albicans* (Okkers *et al.*, 1999).

Lavermicocca *et al.*, (2003) et Gobbetti *et al.*,(2005), ont montré que *Lb. plantarum* 21B et 20B présente une activité antifongique contre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Monilia*. Cette inhibition est attribuée à la production de l'acide phényllactique et l'acide 4-hydroxy-phényllactique. D'autres travaux ont montrés que les lactobacilles sont capables

de produire des substances antifongiques qui inhibent essentiellement les levures et les moisissures comme le cyclo (L-Phe-L-Pro), le cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) et l'acide phenyllactique produits par *Lb. plantarum* MiLAB393 (Lavermicocca *et al.*,2003).

L'étude menée par **Mayra *et al.*, (1994)**, a montré que *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* LC-705 est douée d'une activité antifongique à l'égard de *Candida lusitaniae*. La souche de *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* GG diminue également la colonisation entérique d'espèces de *Candida* chez l'Homme (**Manzoni, 2007**).

III. Extraction des substances antimicrobiennes produites par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*

III.1. La dialyse

La séparation des substances antimicrobiennes produites par *Lb. psearacasei* subsp. *paracasei* est effectuée par dialyse. Après la dialyse, un volume de 1500ml du liquide de contre dialyse est concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif 40 °C, jusqu'à avoir un volume final de 25ml.

Le test d'activité du liquide de contre dialyse, du dialysat et du surnageant concentré est effectué à l'égard d'*E. coli* et de *Candida albicans*.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antimicrobienne de surnageant concentré à l'égard d'*E. coli* et *Candida albicans* est plus importante que celle obtenue avec le liquide de contre dialyse et le dialysat (**Fig. 8.a**) et (**Fig. 9.a**). L'activité de surnageant concentré contenant 320 UA/ml et une concentration en protéine de 25,853 mg/ml est révélée par l'apparition d'une zone d'inhibition de 21 mm de diamètre à l'égard d'*E. coli* et *Candida albicans* (**Tableau VI**). D'après ces résultats, l'activité de surnageant concentré pourrait être due à l'effet combiné entre les substances qui restent dans le dialysat et celles qui ont traversé la membrane de dialyse.

Résultats et discussions

De plus, les résultats obtenus, montrent aussi que l'activité antimicrobienne de liquide de contre dialyse (320 UA/ml et 3,292 mg/ml de protéine) à l'égard d'*E. coli* et de *Candida albicans* est plus importante que celle obtenue avec le dialysat (**Fig. 8.b**) et (**Fig. 9.b**). Cette activité se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition de 11 mm de diamètre à l'égard d'*E. coli* et de 6 mm de diamètre à l'égard de *Candida albicans*, alors que le dialysat donne une zone d'inhibition de 2mm de diamètre (**Tableau VI**). Cela indique que la majorité des substances antimicrobiennes se trouve dans liquide de contre dialyse.

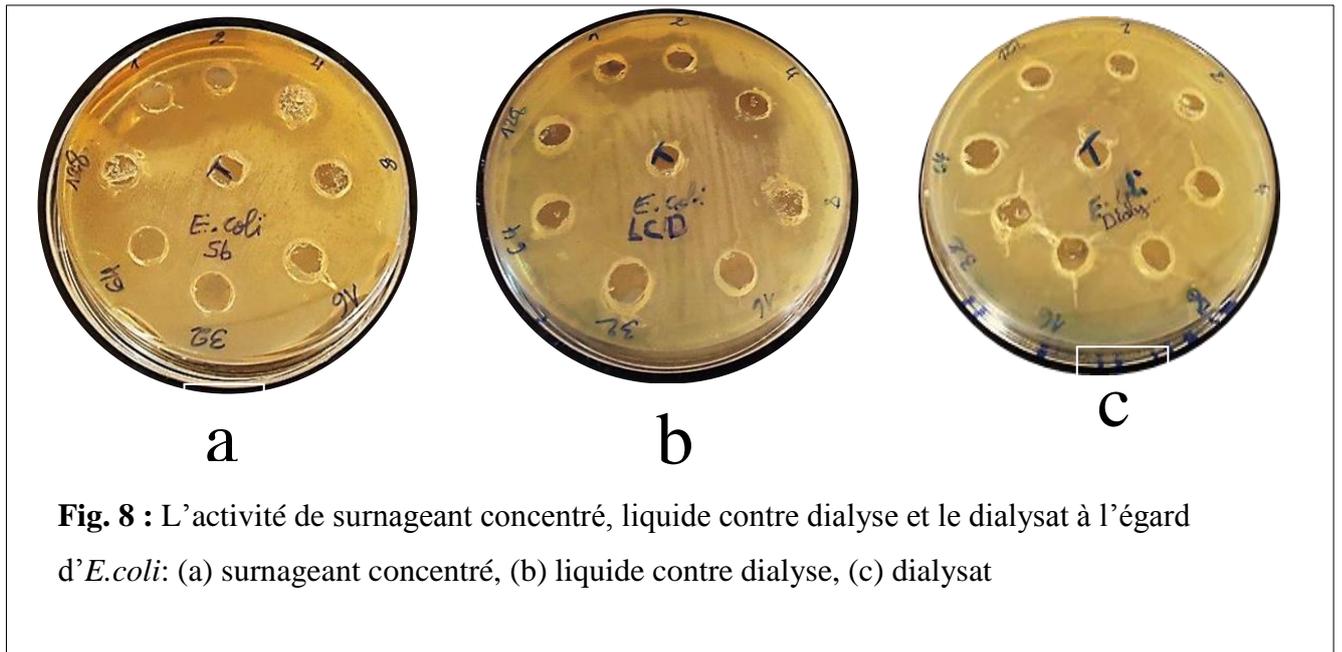


Fig. 8 : L'activité de surnageant concentré, liquide contre dialyse et le dialysat à l'égard d'*E.coli*: (a) surnageant concentré, (b) liquide contre dialyse, (c) dialysat

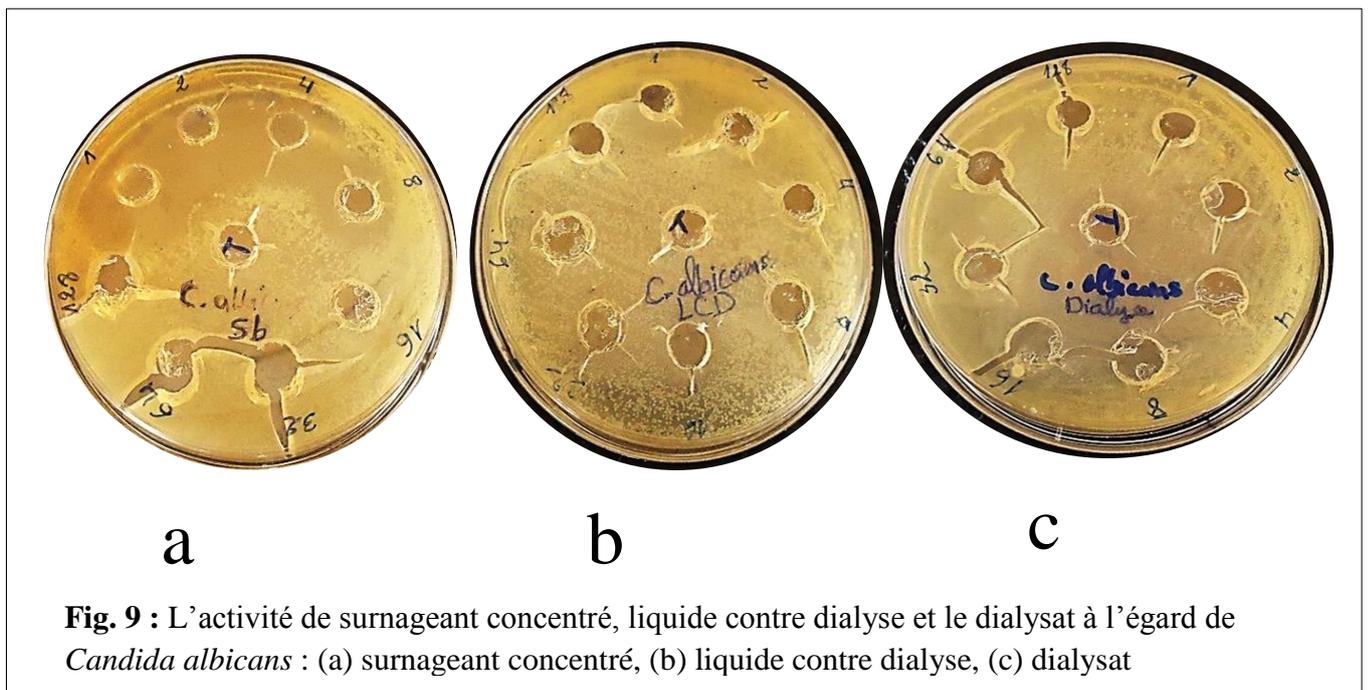


Fig. 9 : L'activité de surnageant concentré, liquide contre dialyse et le dialysat à l'égard de *Candida albicans* : (a) surnageant concentré, (b) liquide contre dialyse, (c) dialysat

Tableau VI : Diamètre des zones d'inhibition et nombre d'unités arbitraire du surnageant concentré, du liquide contre dialyse et du dialysat.

Echantillon	Diamètre des zones d'inhibition (mm)		Unités arbitraires (UA/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Surnageant concentré	21	21	320	320
LCD	11	6	320	320
dialysat	2	2	10	10

Toutes les substances antimicrobiennes qui se trouvent dans le liquide de contre dialyse ont un poids moléculaire inférieure à 5KD ce qui explique leur passage à travers les pores du boudin de dialyse. Ces substances pourraient être des acides organiques ou d'autres substances antimicrobiennes de faibles poids moléculaires de nature protéique ou non protéique. **Bendjeddou et al., (2012)**, ont montré qu'une substance de nature protéique (bactériocine) produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005 est d'une masse moléculaire de 2,5 KDa, cette substance inhibe la croissance de *E. coli*. Selon **Tolinacki et al., (2010)**, *Lb paracasei* subsp *paracasei* BGUB9 produite une bactériocine BacUB9 d'une masse moléculaire de 4KD.

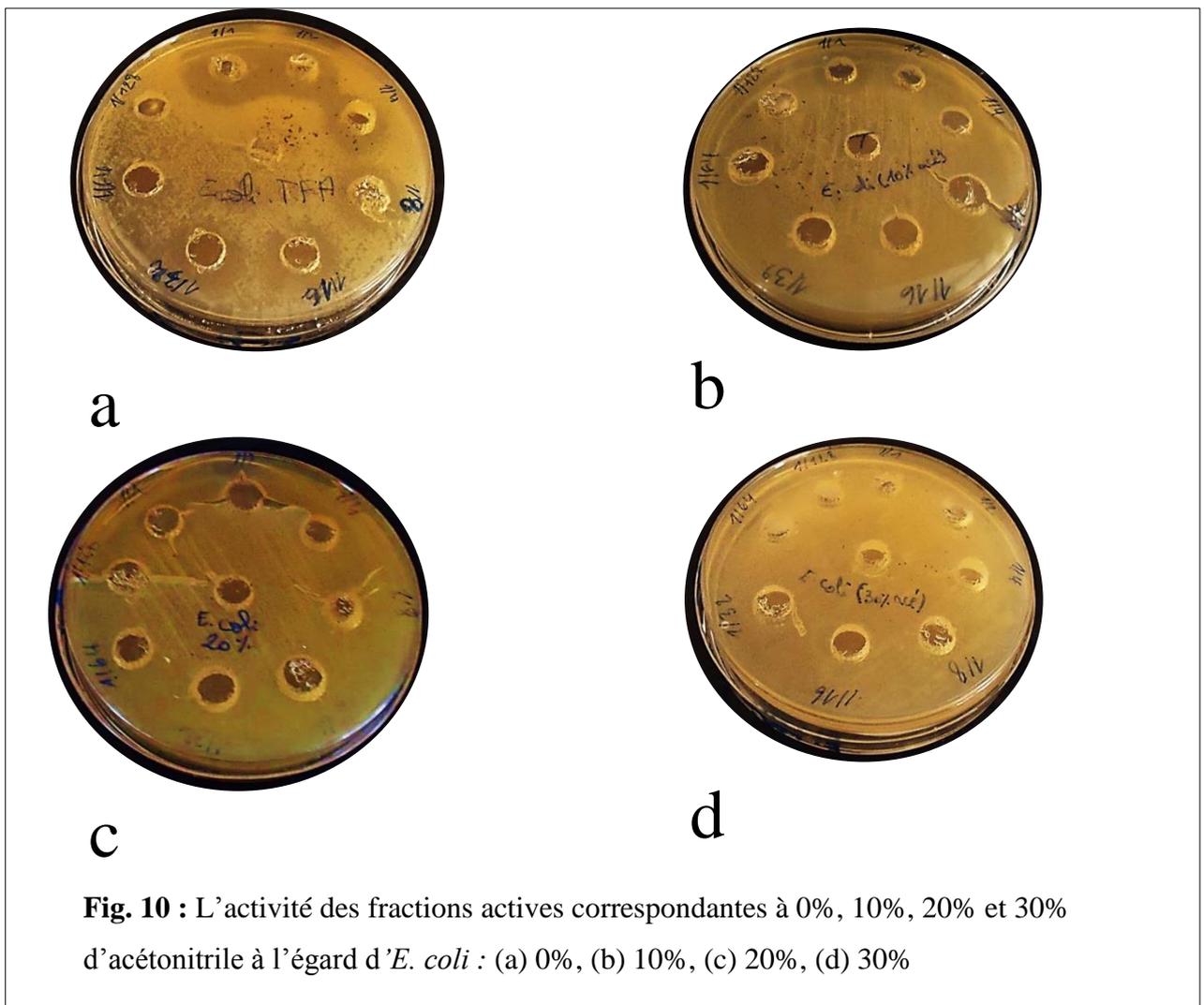
Cependant, l'activité antimicrobienne détectée dans le dialysat (substances qui restent dans le boudin de dialyse) pourrait être attribuée à une substance antimicrobienne ayant un poids moléculaire supérieur à 5KD, ces substances pourraient être une autre bactériocine. Les travaux d'**Atanasova et al. (2003)**, ont montré que *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* M3 produit une substance de nature protéique d'une masse moléculaire de 45 KDa, cette substance est responsable d'un effet antifongique (anti-*Candida albicans*) et antibactérien (anti-*Escherichia coli*).

L'étude réalisée par **Hamdan et ferchichi (2014)**, montre que *Lactobacillus curvatis* produit une bactériocine de poids moléculaire de 5162,17 Da.

Pangsomboon *et al.*, (2009), a montré que *Lactobacillus paracasei* HL32 produit une bactériocine de masse moléculaire de 56 KD.

III.2. Chromatographie en phase inverse

Le test d'activité des six fractions a montré que les fractions correspondant à 0, 10, 20 et 30% d'acétonitrile présentent une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* (**Fig. 10**) et une activité antifongique à l'égard de *Candida albicans* (**Fig. 11**). Les fractions correspondant à 40 et 50% d'acétonitrile ne présentent aucune activité antimicrobienne.



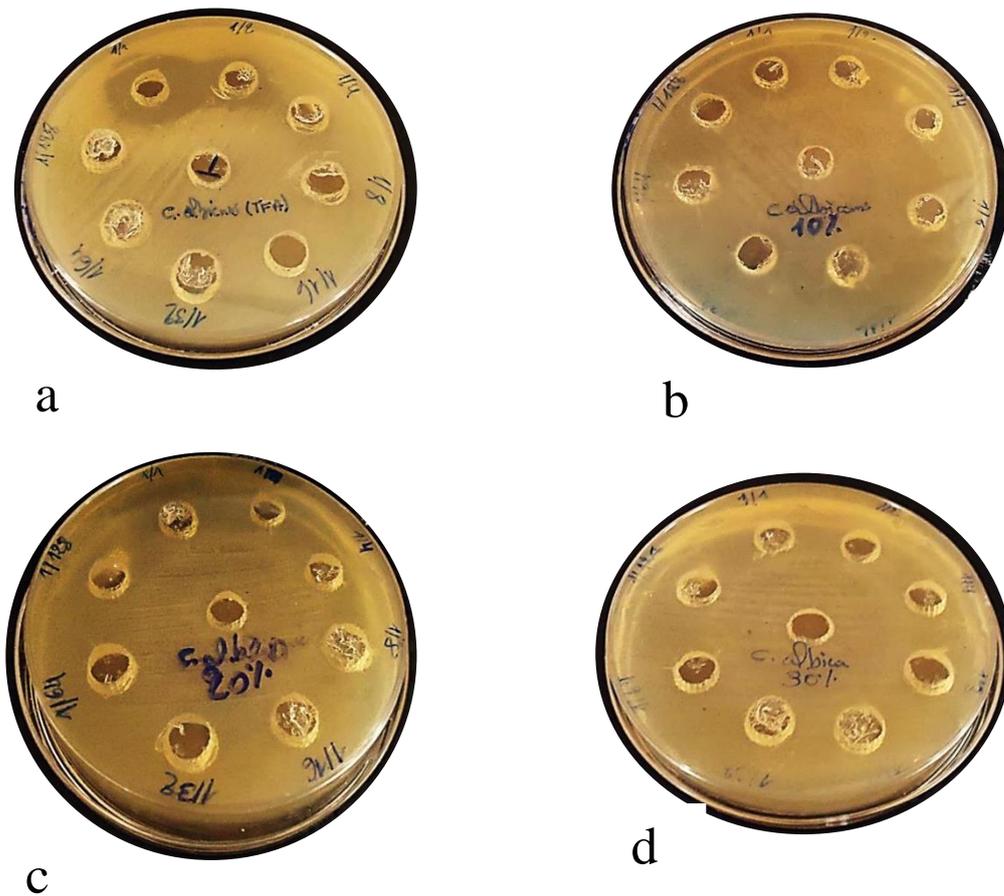


Fig. 11 : L'activité des fractions actives correspondant à 0%, 10%, 20% et 30% d'acétonitrile à l'égard de *Candida albicans* : (a) 0%, (b) 10%, (c) 20%, (d) 30%

Les résultats de test d'activité montrent que le maximum d'activité est trouvé dans la fraction correspondant à 0% d'acétonitrile (640 UA/ml et 0,512 mg/ml en protéine) avec une zone d'inhibition de 21 mm de diamètre pour *E. coli*, et 160 UA/ml avec une zone d'inhibition de 16 mm de diamètre pour *Candida albicans* (**Tableau VII**).

Tableau VII : Diamètre de zone d'inhibition et nombre d'unités arbitraires des fractions actives.

Fraction	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		Unité arbitraire UA/ml	
	<i>E. coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>Candida albicans</i>
0%	21	16	640	160
10%	7	6	40	40
20%	5	4	20	20
30%	3	4	10	10

Dans une chromatographie en phase inverse les molécules sont éluées en fonction de leur polarité (les plus polaires sortent avant les moins polaires). Ainsi, les fractions actives ont une polarité relativement élevée du faite qu'elles sont éluées à des concentrations en acétonitrile inférieur ou égale à 30%.

La présence d'activité antimicrobienne dans la fraction correspond à 0% d'acétonitrile pourrait être due à des substances antimicrobiennes très hydrophiles comme l'acide lactique qui s'accroche très faiblement ou ne s'accroche pas au gel. D'après **Benjeddou (2013)**, la plus grande quantité d'acide lactique produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005 se trouve dans la fraction correspond à 0% d'acétonitrile.

D'après **Lavermicocca et al., (2003)** et **Gobbetti et al., (2005)**, une gamme d'acides organiques tels que les acides : acétique, formique, caproïque, propionique, butyrique et valérique produits par *Lb. sanfranciscensis* CB1, possèdent un effet antifongique contre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Monilia*. *Lb. plantarum* MiLAB 393 est une souche capable d'inhiber la croissance de moisissure *in vitro* en produisant des composants antifongiques identifiés comme étant le 3-phenyllactic acid cyclo (L-Phe-L-Pro) et le cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) (**Strom et al., 2002**).

Selon **Hamed et al., (2011)**, *Lb. plantarum* NRRL B-4524 est doué d'un effet inhibiteur à l'égard de *Botrytis cinerea*, cet effet antifongique est attribué à la production d'acide lactique.

L'activité antimicrobienne est détectée aussi dans les fractions correspondantes à 10, 20 et 30% d'acétonitrile, cela pourrait être expliqué par l'existence de trois substances antimicrobiennes différentes, où chacune d'elle est éluée une concentration d'acétonitrile différente de l'autre (une à 10%, l'autre à 20% et la 3^{ème} à 30%).

La substance éluée à 30% d'acétonitrile suggère qu'il pourrait s'agir d'un polypeptide d'un poids moléculaire et d'une hydrophobicité relativement faible. D'après **Hamdan et Ferchichi (2014)**, une souche de *Lactobacillus curvatus* DN86 produit une substance de nature protéique éluée à 30% d'acétonitrile.

Bendjeddou et al., (2012), ont séparé une bactériocine produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005 de masse moléculaire de 2,5 KDa, cette bactériocine est éluée à 30% d'acétonitrile.

D'après **Kaewsrichan et al., (2006)**, des souches de *Lactobacilles* sont connues producteurs de composés de « bacteriocin like ». Parmi eux, on retrouve les composés produits par *Lb. crispatus* 6L07 et *Lb. jensenii* 5L08, qui ont une activité inhibitrice envers des souches de *Candida albicans*.

Selon **Pascual et al., (2008)**, la bactériocine L23 produite par *Lb. fermentum* L23, présente un effet antifongique à l'égard de *Candida albicans*, 95% des souches étaient inhibées par la bactériocine L23.

Magnusson et al., (2001), ont montré que l'effet antagoniste de *Lb. coryniformis* spbsp. *caryniformis* à l'égard de *Fusarium* et *Aspergillus* est dû à la production de peptides.

IV. Caractérisation physicochimique des substances antifongiques

IV.1. Effet de la température sur l'activité antifongique

L'effet de la température sur l'activité antifongique est étudié à différents couples (température/temps). Les résultats obtenus ont montré que l'activité antifongique de la fraction 0% reste pleinement stable jusqu'à 70°C pendant 20min en donnant des zones d'inhibition d'environ 8 mm (**Fig.12**). Alors qu'à des valeurs supérieures à cette température une perte partielle d'activité antifongique a été détectée. Ainsi, lorsqu'elle est portée à 90°C elle a perdu 17,64%, 23,52%, 29,41% de son activité lorsqu'elle est chauffée pendant 5, 10, 20min respectivement cependant une perte partielle d'activité d'environ 41,17% est observée après traitement des substances antifongiques à 100°C pendant 20min.

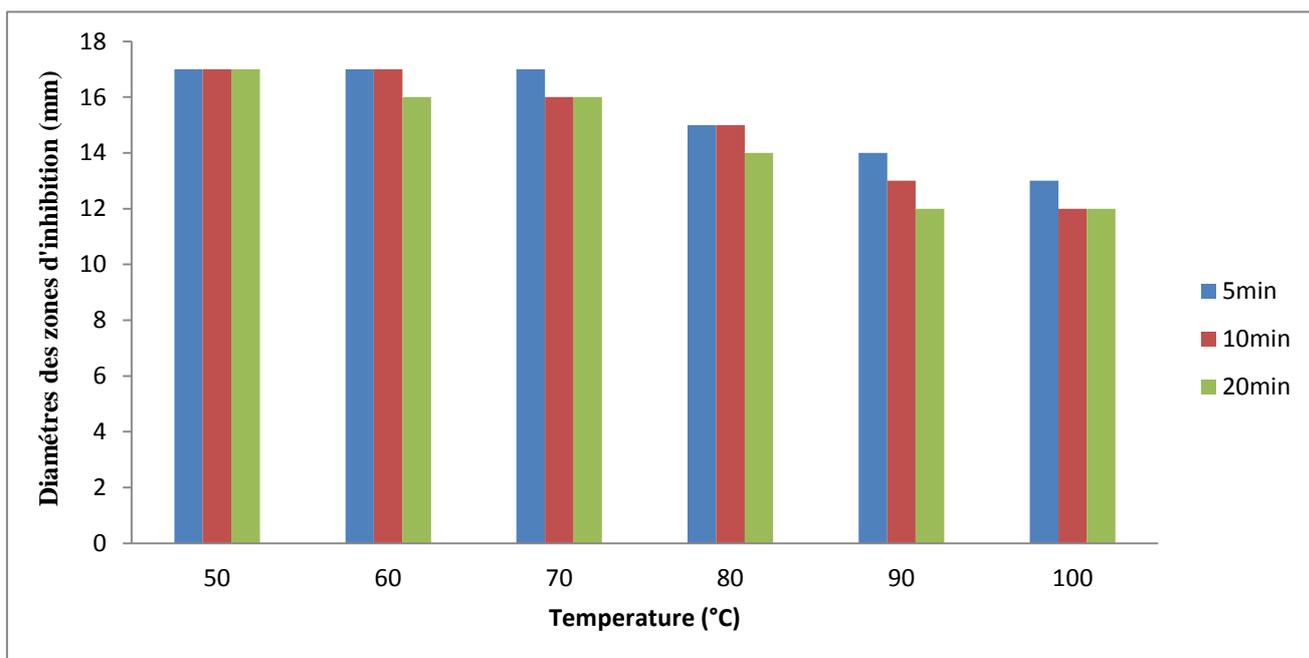


Fig. 12 : Effet de traitement thermique sur l'activité antifongique

Lb. paracasei subsp. *paracasei* produit des substances antifongiques qui présentent une thermostabilité relativement élevée comme les acides organiques et autres substances qui ne sont pas thermostable, ces substances pourraient être de nature protéique.

Hamdan et Ferchichi (2014) ont montrés que *Lactobacillus curvatus* DN86 produit une bactériocine thermostable à 60°C/60 min, mais après traitement à 110°C pendant 60 min, une perte d'activité a été rapportée.

IV.2. Effet du pH sur l'activité antifongique

Les résultats obtenus montrent que l'activité antifongique est maximale de pH 2 à 5 avec des zones d'inhibition de 6 mm de diamètre, ces substances antifongiques pourraient être des acides organiques. Alors que l'activité est partiellement perdue de pH 6 à 9. Le minimum d'activité est trouvé à pH 9 avec une zone de 3 mm de diamètre, cela peut être expliqué par la présence d'autres substances antifongiques actives à pH neutre et pH alcalin qui pourrait être de nature protéique (**Fig. 13**).

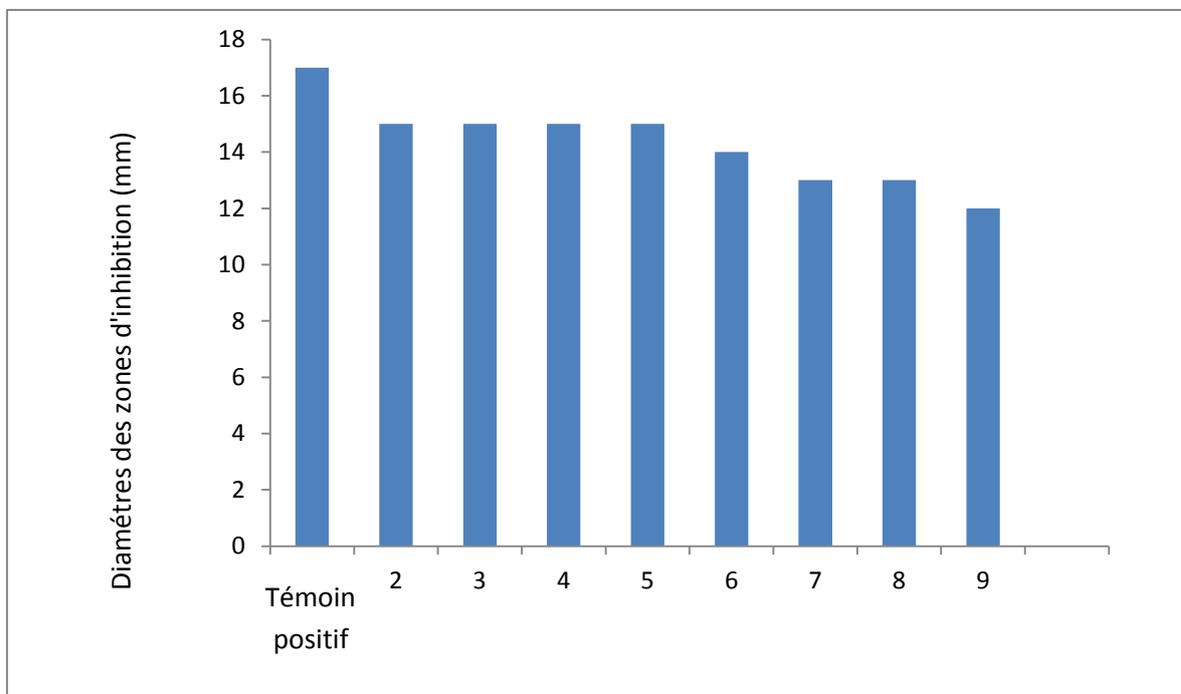


Fig. 13 : Effet de pH sur l'activité antifongiques

D'après Hamdan et Ferchichi (2014), *Lactobacillus curvatus* DN86 produit une substance antimicrobienne active à différentes pH allant de 5 à 8.

Une autre étude réalisée par Laref *et al.*, (2013), a montré que *Lb. plantarum* LB20, *Lb. farcimins* LB53, *Lb. plantarum* LB51, *Lb. plantarum* LB52 et *Lb. plantarum* LB54 produisent des substances antifongiques qui ont une bonne activité à pH acide et à pH neutre.

IV.3. Effet des enzymes protéolytique sur l'activité antifongique

L'étude de l'effet des enzymes protéolytiques sur l'activité des substances antifongiques, produites par la souche *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* a montré que ces substances sont partiellement sensibles à l'effet de la trypsine et de la papaine où une perte d'activité de 11,76% et de 29,41% après traitement par la trypsine et la papaine respectivement a été enregistrée (**fig. 14**). Alors qu'aucune activité n'a été détectée pour le témoin négatif.

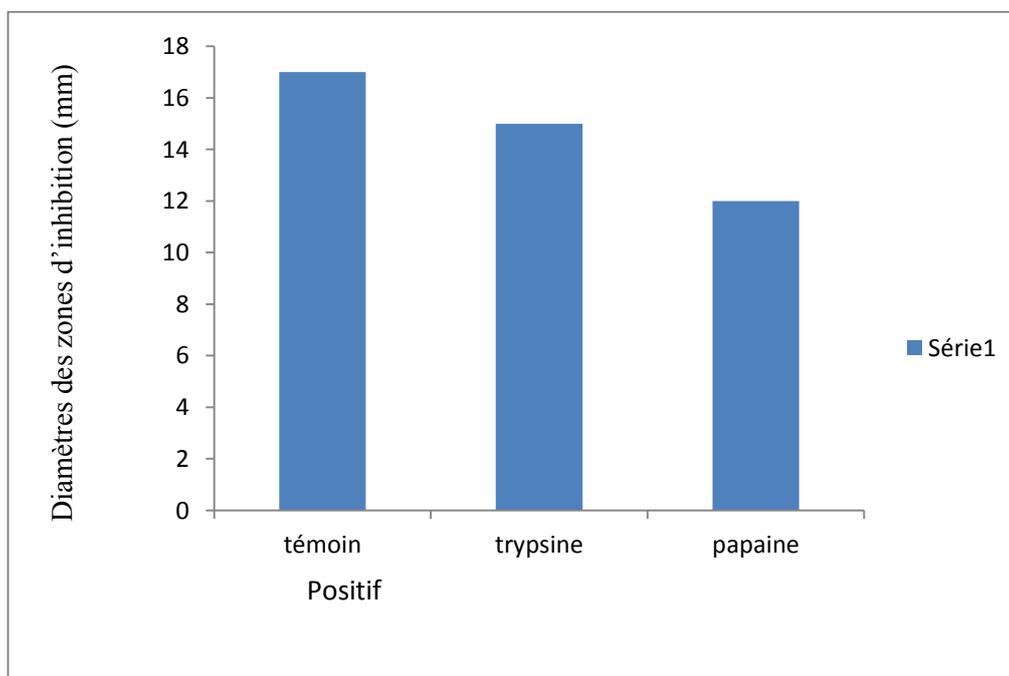


Fig. 14 : Effet des enzymes sur l'activité antifongique

Ces résultats ne permettent pas de déterminer la nature des substances antifongique produite par la souche *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. En effet, plusieurs travaux effectués sur des substances antimicrobiennes de nature protéique ont montré que ces substances purifiées sont insensibles partiellement ou totalement à l'effet des enzymes protéolytiques citées ci-dessus (**Tiwari et Srivastava, 2008**).

De plus, cette activité antifongique pourrait être due à l'effet combiné de plusieurs substances de nature protéiques et non protéiques, ce qui pourrait expliquer la perte partielle de l'activité antifongique après traitement par la trypsine et la papaïne.

Selon **Tiwari et Srivastava (2008)**, une bactériocine produite par *Lb. plantarum* LR/14, a gardé environ 30 à 35% de son activité antibactérienne après traitement avec la papaïne.

L'étude menée par **Mami (2013)** a montré que l'activité antibactérienne des substances produites par *Lb. rhamnosus* et *Lb. plantarum* est partiellement perdue après traitement par la trypsine.

L'étude réalisée par **Hamdan et Ferchichi (2014)**, montre qu'après traitement de la substance antimicrobienne produite par *Lb. gravus* DN86 avec la papaïne et la trypsine que l'activité antimicrobienne est totalement perdue.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail était l'étude de l'effet antifongique de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard de *Candida albicans* et l'extraction des substances responsable de cet effet antagoniste. Cette extraction est effectuée par dialyse et chromatographie en phase inverse sur gel de silice C₁₈.

D'après les résultats obtenus, la souche *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est douée d'une activité antifongique envers *Candida albicans*. Les substances antifongiques sont extraites avec un gradient ascendant d'acétonitrile allant 0%, 10%, 20% et 30% d'acétonitrile. Le maximum d'activité antimicrobiennes est obtenue dans la fraction correspond à 0% d'acétonitrile.

La caractérisation physicochimique des substances antifongiques présent dans la fraction correspond à 0% d'acétonitrile a montré qu'elle est stable jusqu'à 70°C pendant 20min au-delà de cette température une perte partielle d'activité a été détectée, et actives a pH allant de 2 à 9. Le traitement enzymatique de ces substances a montré une perte partielle de l'activité antifongique.

Ces résultats indiquent que l'activité antifongique des substances produites par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est due à des substances protéique et non protéique telle que les acides organiques.

D'après les résultats obtenus, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* produit des substances qui ont un effet antibactérien sur *E. coli* et antifongique envers *Candida albicans*.

Cependant ces résultats restent insuffisants pour tirer une conclusion définitive.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Ababsa A. (2012). Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait mémoire de magister en Génie microbiologique. Université FERHAT Abbas- SETIF. 63p.

Alegre E. I. (2009). les proteines bacterienes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique , thèse de doctorat en chimie analytique, université de strasbourg, P 9.

Ammor M. S. (2004). Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bacteries lactiques. Thèse de Doctora en physicochimie et qualité de bioproduits, Université de Rennes I, France, p 21.

Antonson M, Molin G et Ardo Y. (2003). *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese and their function as adjunct cultures in a cheese model system. Int J of Food Microbiology. 85 : 159-169.

Aronsson L, Huang Y, Parini P, Korach-andre M, Hakansson J, Gustafsson J. A, Pettersson, Arulampalam V et Rafter J. (2010). Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). PLoS ONE. 5 (9) : 1-7.

Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert J. M, Dousset X, Ivonova I. et Haertel T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous antibacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strainM3. Int J food Microbiol. 87 : 63-73.

B

Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». Sci.Technol. 23: 30-37.

Bendali F, Sadoun D, Madi N. (2011). beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. International Journal of Infectious Diseases.15 : 787-794.

Bendjeddou K, Fons M, Strocker P et Sadoun D. (2012). Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005 an intestinal isolate active against multidrug – resistant pathogens. *World J Microbiol Biotech.* 28 (4), 1543-52.

Bendjeddou K. (2013). Effet anti-EPEC de *Lactobacillus paracasei* additionnée à un lait infantile au lactosérum : caractérisation de sa bactériocine. Thèse de Doctorat en Sciences Biologique. Université Abderrahmane Mira. Bejaia. pp 101-105.

Bogovic M. B, Koman R. M et Perko B. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *Int. Dairy J.* 17 : 157-166.

Bourgeois C. M et Larpent J. P. (1996). Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Ed. TEC et DOC. pp 4-32.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein- dye binding *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

Byczkowski J. et Gessner T. (1988). Biological role of superoxide ion radical. *Int J Biochem.* 20 : 569-580.

C

Caridi A. (2002). selection of *E.coli* inhibiting of *Lb paracasei* ssp *paracasei*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology.* 29 : 303-308.

Chobert J. M et Choiset Y. (2011). Développement de cultures bactériennes protectrices antifongiques pour améliorer la conservation des produits laitiers fermentés ; INRA Angers Nantes, UR 1268 BIA. pp : 440-612.

Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 269-280.

Cotter P. D, Hill C. et Ross R. P. (2005b). Bacteriocine : developing Innate Immunity For Food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3 : 777-788.

D

De roissart H. et Luquet F. M. (1994). Bactéries lactiques, aspect fondamentaux et technologiques, (Ed) Loric France, tome I. pp 25 – 590.

De roissart H. et Luquet F. M. (1994). bacteries lactiques, aspect fondamentaux et technologiques, tome II. pp : 111-200.

Dellaglio F, DeRoissart H, Torriani S, Curk M. C, Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart H. et Luquet F. M. Loric Uriage, France.

Desai A. (2008). Strain identification viability and probiotics proprieties of *Lactobacillus casei*. Thesis doctoat of philosophy. University werribee campus victoria school of biomedical and health science, austrialia. 228P.

DeVos P, Garrity G. M., Jones D, Krieg N. R, Ludwing W, Rainey F. A, Schleifer K. H, Whiteman W.B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes.(Ed) Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.

Djossou O. (2011). Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A. thèse de Doctorat en Biologie des Populations et Ecologie. Universite Paul Cezanne, AIX Marseille III. 123p.

Dortu C. et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. , 13: 143-154.

E

Eklund H., Cambillan C., Sjoberg B. M., Holugren A., Jornvalle H., Hoog J. O et Branden C. I. (1984). Conformational and functional similiraties between glutaredoxin and thioredixins EMBO. J. 3 : 1443-1449.

Eklund T. (1989). Orogenic acid and esters. In : Gould G. W. mechanisms of action of food preservation procedures, Elsevie Applied Science, London. pp 161-200.

El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfaxi I, El-Mecherfi K.E, Bazukyan I, Choiset I, Rabesona H, Sitohy M, Popov Y. G, Kuliev A. A, Mozzi F, Chobert J. M, Haertlé T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. Trends in Food Sci. Technol. 22: 509-516.

El-nagger M. Y. M. (2004). Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology*. 3 (2): 173-180.

G

Gawronska A, Dziechciarz P, Horvath A. et Szajewska H. (2007). A randomized double-blind placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG for abdominal pain disorders in children. *Aliment pharmacol. Ther.*, 25 (2) : 177-184.

Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A. et Di Cagno R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* 16 : 57-69.

Gould G. W. (1991). Antimicrobial compound. In : *biotechnology and Food Ingredients*. Eds. Goldberg I. et Williams R. Van Nostrand Reinhold, New York. Pp 461-483.

Guiraud J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. (Ed) dunod. paris, France. 652p.

H

Hamed A. H, Moustafa A. Y. et Abdel-Aziz M. S. (2011). In vivo Efficacy of lactic acid Bacteria in Biological Control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Science J.* 8 (4), 462-463.

Hamdan I. A et Ferchichi M. S. (2014). Purification and characterization of a novel class IIA bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* DN86 isolated from Saudi chicken CECA. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3(4): 641-654.

Hammes W. P. et Hertel C. (2009). Genus I. *Lactobacillus*. Dans : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Second edition, vol 3 (the Firmicutes). Springer Science-Business Media, New York. pp 465-511.

Hassan Y. I. et Bullerman L. (2008). Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *Int. J. Food Microbiol.* 121 :112115.

Hastings J. W, Sailors M, Johnson K, Roy K. L, Vederas J. C, Sliles M. E (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacterio* 173 : 7491-7500.

Hechard Y, Dérijard B, Letellier F, Cenatiempo Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol* 138 : 2725-2731.

Helander I. M, Von Wright A, Mattila sandholm T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram negative bacteria. Trends. Food.Sci. Technol 8 (5) : 146-150.

Heng N.C.K, Wescombe P. A., Burton J. P, Jack R. W, et Tagg J. R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram- positive Bacteria. Dans : Riley M. A. et Chavan M. A : Bacteriocins : Ecology and Evolution, Eds. Springer Science Business, heidelberg, pp 45-92

J

Joerger M. C. et Klaenhammer T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol., 167 : 439-446.

K

Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K. et Kongprasertkit J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. Fems Immunology and Medical Microbiology. 48(1) : 75-83.

Klaenhammer T. R. (1988). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochimie, 70 : 337 –349.

Klaenhammer T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 :39-86.

Klaenhammer T. R, Barraangou R, Buck B. L, Azcarate-Peril M. A. et Altermann E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiol Rev 29 : 393-409.

König H, et Fröhlich J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

L

Lamontagne M, Claude P, Champagne J, Reitz A, Sylvain M, Nancy G, Maryse L, Julie J. et Ismail F. (2002). Microbiologie du lait sciences et technologie de lait école polytechnique montréal.

Laref N, Bettache G. et Kihal M. (2013). Antifungal Compounds Production in Different Temperatures, pH and Modified MRS Agar by *Lactobacillus* Strains. Journal of Biological Sciences. 13 (2) : 94-99.

Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A. et Gobetti M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Applied and Environmental Microbiology, 66 : 4084–4090.

Lavermicocca P., Valerio F. & Visconti A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl. Environ. Microbiol., 69(1), 634–640.

Lindgren S. E. et Dobrogosz W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. FEMS Microbiol. Rev. 87 :149-164.

Louis P, Catherine L. P, Yves T, Benoit F. (2008). Utilisation de *Lb. casei* ssp. *paracasei* comme antifongique.

M

Magnusson M, Arvola A, Hursti U, Aberg L. et Sjoden P. (2001). Attitudes towards organic foods among Swedish consumers. British Food Journal. 103(3) : 209-226.

Mami A. (2013). Recherche des bacteries lactiques productrice de bacteriocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi – infection alimentaire en Algérie. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. Université d'oran. 164p.

Marth E. H et Steele J. L. (2001). Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New york

Mkrtchyan H, Gibbons S, Heidelberger S, Zloh M, Limaki H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. Int.J. Antimicrobial Agents. 35: 255-260.

Mayra-Makinen A. K, Kristianinkatu A, et Suomalainen T. V. (1994). A novel microorganism strain, bacterial preparations comprising said strain, and use of said strain and preparations for the controlling of yeasts and moulds. European Patent Application 0 : 576- 780, A2.

Moraes M. P., Perin L. M., Ortolani M. B. T., Yamazi A. K., Viçosa G. N., Nero L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. Food Sci.Technol . 43: 1320-1324.

N

Niku-Paavola M, Laitila A, Mattila-Sandholm , et Haikara A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology, 86 : 29–35.

O

Okkers D, Dicks L. M. T, Silvester M, Joubert J. J et Odendaal H. J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin – lik peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatique effect on *Candida albicans*. J. Appl. Microbiol. 87 : 726-734.

P

Pangsonboon K, Bansal S, Martin G, Suntainalert P, Kaewnopparat S, et Srichana T. (2009). Further characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. J. Appl. Microbiol. 106 : 1928-1940.

Pascual L. M, Daniele M. B, Walter G, Pajaro M. C et Barberis I. L. (2008). Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. Curr. Microbiol. 56 : 397-402.

Pringsulaka O, Thonggam N, Suwannasai N, Atthakor W, Pothivejkul K, Rangsiruji A. (2011). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food Control, 23: 547-551.

R

Rao D. R, Reddy A. V, Pulusani S. R. et Cornwell P. E. (1984). Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B12 in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1798-1804.

S

Salminen S, Wright A. V, Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

Sanz B, Selgas D, Parejo I. et Ordonez J. A. (1988). Characteristic of Lactobacilli isolated from dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 6 : 199-205.

Schnurer J. et Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives Food Sc-Technol - 16 : 70-78.

Schwenninger S. M. et Meil L. (2004). A mixed culture of *propionibacterium jensunii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. Syst. Appl. Microbiol. 27 : 229-237.

Stiles M. E. et Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol., 36(1) : 1-29.

Strom K, Sjogren J, Broberg A. et Schnurer J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4- OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. Applied and Environmental Microbiology, 68 : 4322–4327.

T

Technical memorandum T M 56-Ie. Online (intrnet). Brabrand, Denmark :

Lactobacillus paracasei Lpc-37. Available from : http://www.Probion.se/files/2012/01/TM_Lpc-37_June20101.pdf. accessed March 21, 2012.

Tolinacki M, Kojic M, Lozo J, Terzic- Vidojevic A, Topisirovic L. et Fira D. (2010) Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9. Arch. Biol. Sci. 62 : 889-899.

Tsia Y. T, Cheng P. C. et Pan T. M. (2010). Immunomodulating activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7- infected mice. J. Agric. Food chem., 58 : 11265-11272.

Tiwari S. K et Srivastava S. (2008). Purification and characterization of plantaricin LR14 : a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. Appl. Microbiol. Biotechnol.79 : 759-767.

V

Verdenelli M. C, Ghellfi F, Silvi S, Orpiani C, Cecchini C. et Cresci A. (2009). probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. J. Nutr, 10, 345 – 353.

X

Xie Y, An H, Hao Y., Qin Q, Huang Y, Luo Y, Zhang L. (2011). Characterization of an anti- Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. Food Control. 22: 1027-1031.

W

Wagner M. K. et Moberg L. J. (1989). Present and futur use of traditional antimicrobiols. Food Technel. 1 : 143-147.

Wang J, Kang L. et Jia H. L. (2004). Generation and characterisation of monoclonal antibodies against Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A). Xi Bao Yi Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 20 (1) : 83-85.

Wilson M. (2008). Bacteriology of Humans: an ecological prespective. Blackwell PubJishing. Oxford.

Y

Yateem A, Balba M. T, Al-Surrayai T, Al-Mutairi B, Al-Daher R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. Int. J. Dairy Sci. 3: 194-199.

Z

Zalan Z, Hudacek J, Stetina J, Chumchalova J. et Halasz A. (2010). Production of organique acide by *Lactobacillus* stains in three different media. Eur. Food Res. Technol., 230 : 395- 404.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures.

Tableau I : Bouillon MRS

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammoniaque	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Na₂CO₃	0,2
CaCl₂	0,1
Eau distillée qsp	1000ml
pH 7	
Autoclaver à 120°C pendant 20min	

Tableau II : Gélose Muller Hinton

Ingrédients	Quantités (g/l)
Extrait de viande	3
Hydrolysa acide caseine	17,5
Amidon	1,5
agar	16
pH 7,3	
Autoclaver à 120°C pendant 20min	

Annexes

Tableau III : Bouillon nutritif

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
pH 7,2	
Autoclaver à 120°C pendant 20min	

Annexe II : Résultats expérimentales

Tableau I : Diamètre des zones d'inhibition résultantes de test d'activité de surnageant brut à l'égard d'*E. coli* et *Candida albicans*

Dilution	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
<i>E. coli</i>	30mm	28mm	20mm	15mm	13mm	12mm	0mm	0mm
<i>C.albicans</i>	30mm	30mm	26mm	17mm	13mm	12mm	0mm	0mm

Tableau II : Diamètre des zones d'inhibition résultantes de test d'activité de LCD à l'égard d'*E. coli* et *Candida albicans*

Dilution	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
<i>E. coli</i>	20mm	19mm	17mm	15mm	13mm	11mm	0mm	0mm
<i>C.albicans</i>	15mm	14mm	13mm	12mm	12mm	11mm	0mm	0mm

Résumé

Une souche *Lb. paracasei* subsp *paracasei* présente une activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis d'*E. coli* et *Candida albicans*.

Dans cette étude la souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a présenté une activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans*. La substance antifongique produite par cette souche a été extraite avec deux méthodes, dialyse et une chromatographie en phase inverse sur gel C₁₈.

Après chromatographie les fractions correspondant à 0%, 10%, 20% et 30% d'acétonitrile présentent une activité antibactérienne et antifongique, ces substances pourraient être de nature différente puisque elles sont éluées séparément. Le maximum d'activité antimicrobienne est trouvé dans la fraction correspond à 0% d'acétonitrile

La caractérisation physicochimique des substances antifongique montre qu'il y a une perte partielle de l'activité antifongique après traitement par la température, le pH et les enzymes.

Mots clés : *Lactobacillus paracasei*, *Candida albicans*, activité antifongique, extraction, caractérisation physicochimique.

Abstract

Strain *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* exhibits antibacterial and antifungal activity towards *E. coli* and *Candida albicans*.

In this study a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* introduced an antifungal activity against *Candida albicans*. The antifungal substance produced by this strain was extracted with two methods, dialysis and reverse phase chromatography gel C₁₈

After chromatography fractions corresponding to 0%, 10%, 20% and 30% acetonitrile show antibacterial activity and antifungal, these substances may be of a different nature since they are eluted separately. The maximum of antimicrobial activity is found in the fraction corresponds to 0% acetonitrile

Antifungal substances physicochemical characterization shows that there is a partial loss of antifungal activity after treatment by temperature, pH, and enzymes.

Key words: *Lactobacillus paracasei*, *Candida albicans*, antifungal activity, extraction, physico-chemical characterization.